

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Universität Mainz
(Ehem. Direktor: Prof. Dr. H. Kliewe)

ZUR BEDEUTUNG DER HYALURONIDASE
FÜR DIE VIRULENZ VON STREPTOKOKKEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg Universität Mainz

vorgelegt von

Hermann Willebrand

aus Meisenheim/Glan

Mainz 1962

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Universität Mainz
(Ehem. Direktor: Prof. Dr. H. Kliewe)

ZUR BEDEUTUNG DER HYALURONIDASE
FÜR DIE VIRULENZ VON STREPTOKOKKEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg Universität Mainz

vorgelegt von

Hermann Willebrand

aus Meisenheim/Glan



Mainz 1962

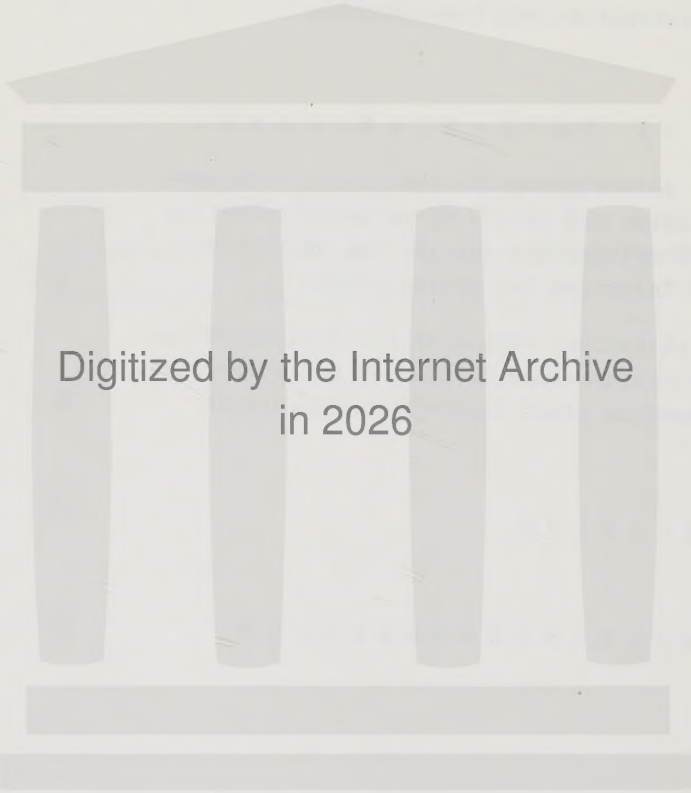
Dekan: Prof. Dr.Dr. K. L a n g

Referent: Dozent Dr. E.v. W a s i e l e w s k i

Korreferent: Prof. Dr. H. K l i e w e

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	<u>Seite</u>
A l l g e m e i n e r T e i l :	
Die Bedeutung der Hyaluronidase für die Infektiosität von Streptokokken	1
E i g e n e U n t e r s u c h u n g e n :	
I. Der Infektionsablauf (Zeitsterblichkeits- relation und LD 50) einer experimentellen A-Streptokokkeninfektion bei nachfolgen- der Injektion von Hyaluronidase	6
II. Quantitativer Vergleich der Hyaluronidase- produktion einer virulenten und avirulenten Stammform eines C-Streptokokkenstammes	16
D i s k u s s i o n	31
L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s	34



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Allgemeiner Teil

Die Hyaluronidase und ihre Bedeutung für die Infektiosität von Streptokokken.

Mit der Entdeckung des "spreading factor" 1933 durch DURAN-REYNALS (3) und der Begriffsetzung dieses Faktors als Invasionsmechanismus (invasiveness) wurde der Anstoß für die zahlreichen weiteren Untersuchungen auf diesem Gebiet gegeben. Der Begriff "spreading factor" wird oft synonym mit Hyaluronidase gebraucht, ist aber nicht damit zu identifizieren GIBIAN (7).

Hyaluronidase ist zwar ein "spreading" begünstigendes Agens, aber nicht jedes solches ist notwendig ein Hyaluronidaseferment.

Eine Gruppe verschiedener Substanzen, die "spreading" Effekt im Gewebe zeigten, wurde von HECHTER (8) als hyaluronatinaktive Körper zusammengefaßt.

Diese hyaluronatinaktiven Substanzen dürften nicht unter die Mucopolysaccharidasen einzureihen sein, auch dürfte ihre eventuelle Bedeutung für eine Streptokokkeninfektion bisher noch weitgehend unbekannt sein.

Mit der Annahme, daß sich die Weiterverbreitung der hyaluronidaseproduzierenden Streptokokken im Gewebe unter Zuhilfenahme dieses Fermentes vollzieht, als ektoenzymatische Leistung des Keimes, mußte diesem Stoff vermehrte Aufmerksamkeit entgegengebracht werden, zumal dieses Ferment, eine im Körper weitverbreitete Substanz, wie die Hyaluronsäure spaltet.

Hyaluronsäure = hochpolymere Verbindung von d-Glukuronsäure und N-Acetyl-d-glucosamin in Glucuronid- oder Hexosamidbindung und Sulfonsäure (Sulfat) Gruppen. Hyaluronsäure tritt frei oder in Verbindung mit Proteinen fast

stets gemeinsam mit Chondroitinschwefelsäure in allen mesodermalen Gewebeanteilen auf BILLERBECK (1).

Die Hyaluronsäure ist als Hauptbestandteil der Bindegewebsgrundsubstanz im gesamten Organismus verbreitet. Ihr Vorkommen ist unter anderem bisher nachgewiesen in:

Glaskörper (Rind, Schwein, Schaf), Kammerwasser (Rind), Nabelschnur (Mensch, Rind, Schwein), Synovialflüssigkeit (Mensch, Rind), Endolympe (Hai), Haut (Kalb, Schwein, Mensch 25-65 mg%), in der Wand von Blut und Lympfgefäßen, Hirn und Rückenmarkshäuten, quergestreifter Muskulatur, Knochen und Knorpel, Tumoren, haemolytischen Streptokokken der serologischen Gruppen A, B, C und weiteren Bakterien verschiedener Herkunft.

Der als Hyaluronidase^(x) bezeichnete Fermentkomplex zeigt nach seiner Herkunft strukturelle Verschiedenheiten, beziehungsweise der Angriff am Substrat setzt an verschiedenen Stellen an, wie es kürzlich für die Blutegelhyaluronidase, die die im Molekülinnern gelegene glukoronidischen Bindungen spaltet, nachgewiesen wurde GIBIAN (7).

Von MEYER und Mitarb. (14) wurde die variierende Aktivität einzelner, aus verschiedenen Organismen gewonnener Hyaluronidasen gegenüber dem Substrat in Abhängigkeit zu ihren p H optima gefunden.

Die Förderung des "spreading" durch Zugabe von Hyaluronidase, gemessen an der Ausbreitung von Indikatorfarbstoffen, wie sie DURAN-REYNALS (4) bei Testeshyaluronidase feststellte, führte zu der Erkenntnis, daß die Zugabe von Hyaluronidase die Diffusion im Gewebe steigert und die Permeabilität von Membranen heraufsetzt.

Wie weit hier die gleichen Bedingungen für die bakteriellen Hyaluronidasen gelten, wird von den einzelnen Autoren verschieden beurteilt.

(x) Die chemische Struktur der Hyaluronidase ist dabei bisher weitgehend unbekannt. Es konnte noch keine Hyaluronidase zur Kristallisation gebracht werden. Papierchromatographisch wurden bei höchstgereinigter Stiertesteshyaluronidase Substanzen (Aminosäuren) gefunden: Asparaginsäure, Serin, Glutaminsäure, Glycin, Threonin, Alanin, Prolin, Tyrosin, Valin, Phenylalanin, Leucin, Isoleucin, Lysin.

Allgemeiner und unspezifischer kann die Hyaluronidase, der sie produzierenden Keime, durch Öffnung der Bindegewebsschranke ihnen den Weg in den Wirtsorganismus bereiten und ihre Ausbreitung fördern DURAN-REYNALS (5). Hierfür sprechen auch die Befunde, daß bei Mischinfektionen harmlose, hyaluronidase-produzierende Stämme pathogenen Keimen, die kein Hyaluronidasebildungsvermögen besitzen, den Weg bereiten und einen generalisierenden Effekt bewirken können.

MC CLEAN (13) und auch K. MEYER (14) heben hervor, daß die Hyaluronidasen primär den sie produzierenden Bakterien überhaupt nur zur Beschaffung von Nährstoffen dienen könnte. Diese Annahme scheint gegeben, wenn man die Tatsache, daß die bakteriellen Hyaluronidasen ihre Hauptwirkung nicht gegen die hochmolekularen Substanzen entfalten, sondern diese mit rascher Reaktionsgeschwindigkeit bis zu den niederen Bruchstücken spalten.

Diese energiereichen Bruchstücke scheinen deutlich das Wachstum und den Stoffwechsel der Keime zu beeinflussen SALLMAN und BIRKELAND und GRAY (21).

Trotz dieser scheinbar gegensätzlichen Befunde muß gesagt werden, daß die Fähigkeit zur Hyaluronidasebildung auf jeden Fall auch die Fähigkeit zum Eindringen und zur Ausbreitung eines Keimes heraufsetzt.

Dieses erhöhte Eindringungsvermögen des Keimes, durch sein Hyaluronidasebildungsvermögen läßt auf Grund von Beobachtungen an Modellinfektionen begrenzte Schlüsse auf die Virulenz des Keimes zu.

KLIEWE und von WASIELEWSKI (11) weisen darauf hin, daß die einzelnen Pathogenitätsfaktoren und Infektiositätsfaktoren, je nach der vorliegenden Situation unter der sie gegebenenfalls zur Entfaltung kommen, unterschiedliche Reaktionen im Verlauf des Infektionsvorganges bewirken können. Dieser Hinweis dürfte auch in besonderem

Maße bezüglich der pathogenetischen Bedeutung der Hyaluronidase gelten.

Die gegensätzlichen Befunde des Hyaluronidaseeffektes bei verschiedenen Streptokokkenstämmen ist offenbar dadurch gegeben, daß neben der Hyaluronidase von den gleichen Keimen auch Hyaluronsäure produziert wird. PIKE (15) hebt in seinen Untersuchungen hervor, daß eine Koexistenz beider Substanzen in jungen Kulturen möglich sei. Im weiteren Verlauf der Bebrütung solcher Kulturen kommt es dann zu einem Schwund der aus Hyaluronsäure bestehenden Streptokokkenumhüllung, als Ausdruck der Hyaluronidaseaktivität. Wenn man hingegen die Hyaluronsäureumhüllung des einzelnen Keimes als Schutzmechanismus gegenüber der Phagozytose annimmt KASS und SEASTONE (8), dann käme unter diesen Umständen der Hyaluronidase sogar eine virulenzmindernde Bedeutung zu.

HIRST (9) nahm diese Beobachtung auf, und es gelang ihm, durch Applikation von Hyaluronidase in das Infektionsfeld eines bekapselten C-Streptokokkenstammes, die infizierten Tiere vor einer sonst tödlich verlaufenden Infektion weitgehend zu schützen. ROTBARD (19) konnte diese Befunde bestätigen. Der genannte Autor verwendete mit einer Hyaluronsäureumhüllung umgebene Streptokokken der serologischen Gruppen A und C, und zwar sowohl virulente als auch avirulente Stammvarianten. Bei den Versuchen dieses Autor konnten, bei gleichzeitiger Gabe von Hyaluronidase in das Infektionsfeld, Mäuse gegen die 100-fache MLD eines C-Streptokokkenstammes geschützt werden.

Bei einem A-Streptokokkenstamm ergab die gleichzeitige Applikation von Hyaluronidase in das Infektionsfeld nur einen Infektionsschutz bis zu einer 10-fachen MLD. Wurde jedoch (wie in eigenen Versuchen 1. Abschnitt) das Ferment zwei Stunden nach der Keiminokulation in das Infektionsfeld appliziert, so wurde kein Infektionsschutz, sondern eine erhöhte Absterbegeschwindigkeit der infizierten Tierkollektive erreicht.

Wurde auf der einen Seite der Schutzeffekt der Hyaluronidase betont, so fanden SALLMAN und BIRKELAND (20) und auch von WASIELEWSKI (25) in ihren Untersuchungen eine deutliche Virulenzsteigerung bei dem Ablauf einer experimentellen A-Streptokokkeninfektion durch Zugabe dieses Enzyms in das Infektionsfeld.

Von SALLMAN und BIRKELAND (20) wurden zur Messung der Streptokokkenvirulenz und ihrer Beeinflussung durch Hyaluronidase, Hühnerembryonen verwendet. Die Autoren fanden, daß nicht-hyaluronidaseproduzierende Stämme der serologischen Gruppe A in 24 Stunden 20 bis 40 % der infizierten Hühnerembryonen abtöteten. Ein weiterer, schwach hyaluronidasebildender A-Streptokokkenstamm tötete 70 % und ein anderer, stark hyaluronidasebildender Streptokokkenstamm tötete 100 % der infizierten Hühnerembryonen in der gleichen Zeiteinheit.

Die Simultanimpfung von A-Streptokokken und Hyaluronidase zeigte, daß sowohl die nicht-hyaluronidasebildenden, wie die hyaluronidasebildenden Stämme deutlich in ihrer Virulenz gesteigert werden konnten.

Entsprechende Beobachtungen von von WASIELEWSKI (25) konnten in eigenen Versuchen (Abschnitt 1) bestätigt werden. Der letztgenannte Autor konnte einen deutlich virulenzsteigernden Effekt durch Applikation von Hyaluronidase in das Infektionsfeld der mit A-Streptokokken infizierten Mäuse erzielen. Dieser Effekt wurde in einer erhöhten Absterbegeschwindigkeit der infizierten Tierkollektive (Mäuse) statistisch signifikant. Eine Erhöhung der LD 50 gegenüber den Kontrollkollektiven ließ sich auch in diesen Untersuchungen nicht nachweisen, wie es sich mit den eigenen Untersuchungen im ersten Abschnitt dieser Arbeit deckt.

Abschließend kann aber gesagt werden, daß der Hyaluronidase besonders bei Streptokokkeninfektionen, wie sie im Experiment ablaufen, bezüglich der Erregerinfektiosität eine bemerkenswerte Bedeutung zukommt.

E i g e n e U n t e r s u c h u n g e n

I. Der Infektionsablauf (Zeitsterblichkeitsrelation und LD 50) einer experimentellen A-Streptokokkeninfektion bei nachfolgender Injektion von Hyaluronidase.

In den vorhergehenden Ausführungen wurde die Hyaluronidase als Invasionsfaktor und ihre Bedeutung für die Infektiosität der A-Streptokokken herausgestellt. Das ambivalente Verhalten des Fermentkomplexes kann sich in zwei Richtungen auswirken:

- 1) In der Förderung der Erregerausbreitung im Gewebe, welches eine Virulenzsteigerung bedeutet oder
- 2) eine Hinderung der Erregerausbreitung durch Zerstörung der Hyaluronsäurehülle des Keimes, welches eine Virulenzminderung darstellt.

In den nachfolgenden Versuchen sollte geklärt werden, ob die von SALLMAN und BIRKELAND (20) und von von WASIELEWSKI (25) erhobenen Befunde der Steigerung des Virulenzverhaltens von A-Streptokokken durch Zugabe von Hyaluronidase an dem von uns verwendeten Teststamm der Laborbezeichnung Nr. 1 bestätigt werden konnte. Da in den Untersuchungen des letztgenannten Autors die Simultaninjektion von A-Streptokokken und Hyaluronidase in das Injektionsfeld nicht die gleiche Erhöhung der Absterbegeschwindigkeit infizierter Tierkollektive erzielt wurde, sondern erst die nachfolgende Gabe (2 Stunden post injektionem) von Hyaluronidase, ebenfalls ins Infektionsfeld, einen Unterschied der Absterbegeschwindigkeit zu den Kontrolltieren ergab, wurde in den folgenden Versuchen hiervon ausgegangen. Zur Verwendung kam ein unter der Laborbezeichnung Nr. 1 geführter Streptokokkenstamm der serologischen Gruppe A. Der lyophilisierte Teststamm,

der bei vorausgegangenen Untersuchungen eine genügend hohe Mäusepathogenität gezeigt hatte, wurde nach der folgenden Methode verwendet:

Der Stamm wurde in 2 ml einer einfachen Nährbouillon (Fleischwasser, 2 % Wittepepton; NaCl-Gehalt 0,9 %, pH-Wert 7,5) gelöst. Von dieser Keimsuspension wurden 0,5 ml in 10 ml der gleichen Bouillon gegeben und diese 14 Stunden bei 37° C bebrütet. Gleichzeitig wurden auch 2 Normaloesen der Keimlösung auf eine, 5 % defibriniertes Schafsblood enthaltene, Blutagarplatte als Reinheitskontrolle ausgestrichen und ebenfalls (18 Stunden) bebrütet. Nach 14-stündiger Bebrütungsdauer wurde die Bouillonkultur zentrifugiert und dekantiert. Der Keimrückstand wurde in 10 ml steriler physiologischer NaCl-Lösung resuspendiert. 0,5 ml dieser konzentrierten Keimaufschwemmung wurde dem ersten Passagetier(x) intraperitoneal injiziert.

Nach Absterben des Passagetieres wurde dieses seziert und unter sterilen Bedingungen wurden 4 Normaloesen Herzblut entnommen, von denen je 2 Oesen erneut in 5 ml der Nährbouillon verimpft wurden. Diese Tierpassagekulturen wurden wieder 14 Stunden bei 37° C bebrütet und dann nach demselben Verfahren, wie oben beschrieben, verarbeitet. 0,5 ml der Keimaufschwemmung wurden dann wieder dem nächsten Passagetier intraperitoneal injiziert und so laufend fort.

Auch hier wurde als Reinheitskontrolle eine Normaloese Herzblut auf eine 5%ige Blutagarplatte ausgestrichen, die 18 Stunden bei 37° bebrütet wurde. Die Nährbodenpassagekulturen wurden entsprechend den wechselnden Passagen des Tierpassagestammes jedesmal erneut von Nährboden zu Nährboden (5 % defibriniertes Hammelblut enthaltende Agarplatte) verimpft und 18 Stunden bei 37° C bebrütet.

Nach je fünf intermittierenden Tier-Nährbodenpassagen führten wir einen Virulenztest durch, um eine eventuelle Steigerung des Teststammes in seinem Virulenzverhalten unter den gewählten Bedingungen zu ermitteln. Für den Nährbodenpassagestamm verfahren wir in der gleichen Weise, um ihn in seiner Virulenz dem Tierpassagestamm gegenüber stellen zu können. Eine eventuelle Differenz im Virulenz-

(x) Die Passagemäuse waren männliche Inzuchttiere eines Albinostammes. Sie waren 4 - 5 Wochen alt, mit einem durchschnittlichen Gewicht von 15 - 20 Gramm. Alle Tiere erhielten die gleiche Nahrung und wurden zu je 5 Tieren in Glaskäfigen unter den gleichen Lebensbedingungen gehalten.

grad beider Stammformen sollte in späteren Versuchen Verwendung finden. Zur Testung der Virulenz gebrauchten wir 14 Stunden alte Bouillonkulturen beider Stammformen.

Mit drei Oesen der letzten Passage des Nährbodenstammes und mit drei Normaloesen vom Herzblut des zuletzt verstorbenen Passagetieres wurden je 10 ml Nährbouillon beimpft. Die Kulturen wurden 14 Stunden bei 37° C bebrütet, zentrifugiert (20 Minuten bei 3000 Umdrehungen/min.) und dekantiert. Das Sediment wurde mit 10 ml einer 0,9 %igen physiologischen Kochsalzlösung durch kräftiges Umschütteln in einem durch Glaskolben verschlossenen Reagenzgläschen resuspendiert. Von dieser konzentrierten Keimaufschwemmung wurde 1 ml in ein weiteres Röhrchen, das 9 ml einer sterilen physiologischen Kochsalzlösung enthielt, gegeben und so laufend fort, so daß folgende Verdünnungsreihe entstand:
Unverdünnt 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10 000, 1:100 000,
1:1 000 000.

Von jeder dieser Verdünnungsstufen wurden 0,5 ml einer Maus i.p. injiziert. Der Tod der Tiere wird in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt. Zur Sicherung, ob in den hohen Verdünnungsstufen noch Keime enthalten waren, wurde immer eine Normaloese der jeweiligen Verdünnungsstufe auf den Sektor einer Blutagarplatte ausgestrichen. Die Blutplatten wurden 18 Stunden bei 37° C bebrütet. Alle zeigten, auch in den höchsten Verdünnungsstufen, Wachstum von beta-haemolytischen Streptokokkenkolonien.

Tab. 1

Zahl der Passagen	0	0	10	5	20	10	30	15	40	20
Verdünnungsstufen	Nb-	Ti.	Nb-	Ti.	Nb-	Ti.	Nb-	Ti.	Nb-	Ti.
zur Ermittlung der	St.	St.	St.	St.	St.	St.	St.	St.	St.	St.
MLD	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
konz.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:10	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
1:100	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
1:1000	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
1:10000	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
1:100000	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1:1000000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Zeichenerklärung: + = Tod der Tiere innerhalb 96 Stunden
- = Tiere überleben innerhalb 96 Stunden

In der Tabelle sind die Ergebnisse der jeweils im Anschluß an fünf Tier-Nährbodenpassagen bzw. zehn Nährbodenpassagen getesteten MLD aufgeführt.

Die ermittelten Werte können und sollen nicht als exakte Virulenzmessung gewertet werden. Sie sollen lediglich zeigen, ob der gewählte Teststamm unter den beschriebenen Bedingungen eine genügende Mäusevirulenz entwickelt.

Die Ergebnisse der Tab. Nr. 1 lassen deutlich erkennen, daß der gewählte Teststamm eine genügende Mäusevirulenz entwickelte, um für den nachfolgenden Versuch zur Verwendung zu kommen. Um die Virulenz des Stammes zu markieren, wurde auch nach der 20. Tierpassage die LD 50 des Stammes ermittelt.

Wie bei den vorausgegangenen Vorversuchen, die die Virulenz des Stammes ermitteln sollten, wurde auch hier nach der gleichen Methode gearbeitet, ebenso wurden die gleichen Materialien verwendet. Dazu wurden Kollektive von jeweils sechs Tieren benutzt, die alle unter den gleichen Bedingungen gehalten worden waren und den schon früher verwendeten Tieren entsprachen.

Die Absterbezeiten der einzelnen Verdünnungsstufen sind in der nachfolgenden Tabelle wiedergegeben.

Tab. 2

Absterbezeiten (in Minuten) von Inzuchtmäusen, die mit fallenden Keimmengen des Teststammes i.p. infiziert wurden, nach Ablauf von 20 Tier-Nährbodenpassagen.

Zur Verwendung kommende Keim- verdünnung	Tier Nr.					
	1	2	3	4	5	6
unverdünnt	270	290	305	3 10	350	375
1:10	380	410	435	450	490	505
1:100	465	530	560	580	600	645
1:1000	595	640	700	735	770	820
1:10000	810	870	950	980	1050	1205
1:100000	1075	1210	1245	1370	-	-
1:1000000	2810	5270	7920	15600	-	-
1:10000000	5900	-	-	-	-	-

Die ermittelte LD 50, errechnet nach der Methode von REED und MUENCH (17), ergab einen Wert (nach der 20. Tier-Nährbodenpassage) von 1:1321000

Nach der Festlegung der LD 50 des Teststammes wurde nun der Versuch, der eine Aussage über die Bedeutung der Hyaluronidase als Virulenzfaktor geben konnte, durchgeführt. Es wurde von der Voraussetzung ausgegangen, daß im Infektionsfeld auftretende Hyaluronidase einen Einfluß auf den Ablauf einer experimentell gesetzten Streptokokkeninfektion haben werde und zwar im Sinne einer Virulenzsteigerung, wie es die Versuche von SALLMAN und BIRKELAND (20) und weiter von v. WASIELEWSKI (25) bisher gezeigt haben.

Die Versuchsanordnung war die gleiche, wie sie bei den vorausgegangenen Untersuchungen zur Ermittlung der Virulenz des Stammes schon befolgt worden war. Nach der zwanzigsten intermittierenden Tier-Nährbodenpassage wurden Tiere mit fallenden Verdünnungsstufen einer Suspension (0,5 ml) des Teststammes infiziert und anschließend, zwei Stunden nach erfolgter Injektion, wurden wieder 0,5 ml einer 100 E/ml enthaltenden Hyaluronidaselösung (Apertase ohne Konservierungsmittel) ins Infektionsfeld (Peritoneum) gegeben. Als Kontrolle diente ein parallel laufender Versuch, in dem den Tieren statt einer Hyaluronidaselösung, 0,5 ml einer sterilen physiologischen Kochsalzlösung nachinjiziert wurde.

In den nachstehenden Tabellen sind die Ergebnisse dieses Versuches einander gegenübergestellt.

Tab. 3

Absterbezeiten (in Minuten) und Absterbe-
geschwindigkeiten von je sechs Tieren nach i.p. Injektion einer Suspension
des Teststammes in physiologischer NaCl-Lösung und Nach-
injektion von 0,5 ml einer physiologischen NaCl-Lösung
(Kontrolle)

Zur Verwendung kommende Keim- verdünnung	Tier Nr.					
	1	2	3	4	5	6
unverdünnt	265 0,377	300 0,333	345 0,285	370 0,270	405 0,246	410 0,243
1:10	190 0,526	420 0,238	490 0,204	540 0,185	635 0,157	810 0,123
1:100	480 0,208	595 0,168	680 0,147	690 0,144	795 0,125	890 0,112
1:1000	795 0,125	890 0,122	920 0,108	1150 0,086	- 0,000	- 0,000
1:10000	990 0,101	1180 0,084	1280 0,078	1520 0,065	- 0,000	- 0,000
1:100000	585 0,170	8500 0,011	- 0,000	- 0,000	- 0,000	- 0,000

Diese Tabelle zeigt die Absterbezeiten und Absterbe-
geschwindigkeiten von streptokokkeninfizierten Mäusen, wo-
bei die Erreger in physiologischer NaCl-Lösung aufge-
schwemmt waren. Nachinjektion nach zwei Stunden mit 0,5 ml
physiologischer NaCl-Lösung (Kontrolle).

Tab. 4

Absterbezeiten (in Minuten) und Absterbe-
geschwindigkeiten von je sechs Tieren nach i.p. Injektion einer Suspension
des Teststammes und i.p. Nachinjektion (2 Std.) einer
hyaluronidasehaltigen Lösung (100 E pro ml).

Zur Verwendung kommende Keim- lösung	Tier Nr.					
	1	2	3	4	5	6
unverdünnt	135 0,740	285 0,350	290 0,344	295 0,338	320 0,312	395 0,253
1:10	230 0,434	350 0,285	385 0,259	395 0,253	465 0,215	- 0,000
1:100	395 0,253	460 0,217	480 0,208	505 0,198	520 0,192	660 0,151
1:1000	585 0,170	690 0,144	715 0,139	760 0,131	815 0,122	860 0,116
1:10000	1130 0,088	1290 0,077	1290 0,077	1300 0,076	1380 0,072	- 0,000
1:100000	- 0,000	- 0,000	- 0,000	- 0,000	- 0,000	- 0,000

In dieser Tabelle sind die Absterbezeiten und Absterbe-
geschwindigkeiten von streptokokkeninfizierten Mäusen, denen
zwei Stunden nach der Keiminokulation pro Tier 0,5 ml
einer 100 E/ml enthaltenden Hyaluronidase-Lösung i.p.
gegeben worden war, festgehalten.

Tab. 5

Inj. Keim- verdünnung	<u>Versuch</u>		<u>Kontrolle</u>		t-Werte	P-Werte
	Mittelw.	Streuung	Mittelw.	Streuung		
unverdünnt	286 0,389	$\pm$ 83,0 $\pm$ 0,175	349 0,293	$\pm$ 57,9 $\pm$ 0,052	1,2907	P=>0,05
1:10	365 0,241	$\pm$ 86,2 $\pm$ 0,140	514 0,238	$\pm$ 208,4 $\pm$ 0,146	0,0266	P=>0,05
1:100	503 0,203	$\pm$ 88,3 $\pm$ 0,033	688 0,150	$\pm$ 144,3 $\pm$ 0,034	2,6978	P=<0,05
1:1000	737 0,137	$\pm$ 97,5 $\pm$ 0,019	938 0,071	$\pm$ 150,5 $\pm$ 0,057	2,6536	P=>0,05
1:10000	1278 0,065	$\pm$ 287,5 $\pm$ 0,032	1242 0,054	$\pm$ 220,6 $\pm$ 0,043	0,4676	P=>0,05

In dieser Tabelle sind die mittleren Absterbezeiten und auch die Absterbegeschwindigkeiten, sowie ihre Streuung eingetragen. Außerdem sind die Ergebnisse der Mittelwertsvergleiche zwischen den mittleren Absterbegeschwindigkeiten des Versuchs und denen der Kontrolle einander gegenübergestellt.

Aus den gegenübergestellten Ergebnissen der beiden Tabellen läßt sich eine deutliche Erhöhung der mittleren Absterbegeschwindigkeiten der entsprechenden Tierkollektive im Vergleich zu den Kontrollen ablesen.

In den Tabellen 3 und 4 wurden die Absterbezeiten in Absterbegeschwindigkeiten umgerechnet. Dies geschah nach der Methode von PRIGGE (16), indem die Reziprokwerte der Absterbezeiten mit 100 multipliziert wurden.

Die Tabellen lassen deutlich die Erhöhung der mittleren Absterbegeschwindigkeiten erkennen, wenn den Tierkollektiven zwei Stunden nach der Keiminokulation Hyaluronidase ins Infektionsfeld gegeben wurde. Die Differenz zwischen der mittleren Absterbegeschwindigkeit wird besonders in den Verdün-

nungen 1:100 und 1:1000 statistisch signifikant, d.h. unter Berücksichtigung der Streuung ist sie jenseits der Zufallsbedingtheit bei einem Kriterium von $P = 0,05$.

Der Vergleich der beiden Meßkollektive wurde nach STUDENT (23) durch Berechnung der statistischen Signifikanz einer Differenz zweier Mittelwerte bei einem gewählten Kriterium durchgeführt.

Das Ergebnis dieses Versuches zeigt, daß es bei der nachfolgenden Injektion von Hyaluronidase in bereits infizierte Tiere zu einer Änderung des Infektionsablaufes kommt und zwar im Sinne einer erhöhten Absterbegeschwindigkeit.

Legt man die ebenfalls erhobenen Befunde von SALLMAN und BIRKELAND (20) und die von v. WASIELEWSKI (25) der Auswertung zu Grunde, so kann man nach den vorausgegangenen und selbst gefundenen Ergebnissen die Hyaluronidase als einen virulenzsteigernden Faktor im Ablauf einer, hier experimentell gesetzten, Streptokokkeninfektion ansehen.

Man hätte zudem erwarten können, daß gleichzeitig mit der Erhöhung der Absterbegeschwindigkeiten bei Zugabe von Hyaluronidase ins Infektionsfeld, auch eine entsprechende Erhöhung der LD 50-Werte eingetreten wäre. Die LD 50 der Tierkollektive bei Nachinjektion von Hyaluronidase beträgt jedoch 1:19950 gegenüber der Kontrolle mit 1:17780, was bei den hohen Verdünnungsstufen von je einer Zehnerpotenz als fast identisch anzusehen ist. Die LD 50 wurde auch hier nach der Methode von REED und MUENCH (17) errechnet.

Weitere Rückschlüsse lassen sich aus den Versuchen nicht ziehen, zumal der Ablauf einer natürlich verlaufenden Streptokokkeninfektion und die Hyaluronidaseproduktion des einzelnen Keimes sich unserer meßbaren Möglichkeiten weitgehend entziehen.

Nach der Herausstellung der Hyaluronidase als einen virulenzsteigernden Faktor im Ablauf einer Streptokokkeninfektion, sollte nun an dem gleichen Stamm der quantitative Unterschied in der Produktion von Hyaluronidase für eine virulente als auch für eine avirulente Stammform gemessen werden.

Leider zeigte der bisher verwendete A-Stamm ein nicht genügendes Hyaluronidasebildungsvermögen, so daß in den weiteren Versuchen der später beschriebene C-Streptokokkenstamm zur Verwendung kam.

II. Quantitativer Vergleich der Hyaluronidaseproduktion einer virulenten und avirulenten Stammform eines C-Streptokokkenstammes.

In weiteren Untersuchungen sollte festgelegt werden, inwieweit sich ein Streptokokkenstamm in seiner virulenten und avirulenten Form in der Hyaluronidaseproduktion quantitativ unterscheidet.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollten zur Beantwortung folgender Fragen herangezogen werden:

- 1) In welchem Maße ist der Ablauf einer experimentellen Streptokokkeninfektion durch im Infektionsfeld auftretende Hyaluronidase beeinflussbar?
- 2) Besteht eine Parallelität zwischen der Virulenz eines Keimes und seiner Hyaluronidaseproduktion?

Es muß gleich gesagt werden, daß Schlußfolgerungen zur Parallelität zwischen der Virulenz des Keimes und der Hyaluronidaseproduktion des in vitro ablaufenden Versuches nur begrenzt zulässig sind GIBIAN (7).

Die Gründe für diese Feststellung sind folgende:

Einmal sind die Vorgänge, gerade fermentativer Natur, wie sie sich zwischen eindringendem Keim und Wirtsorganismus abspielen, weitgehend unbekannt. Zum anderen könnte die Hyaluronidase möglicherweise unter Bedingungen des Vorkommens im Wirt produziert werden, wie sie sich in vitro nicht reproduzieren läßt.

Damit erfahren sinngemäß die gefundenen Versuchsergebnisse zur Beantwortung der gestellten Fragen eine gewisse Einschränkung. In den Voruntersuchungen wurden mehrere Streptokokkenstämme verschiedener serologischer Gruppen auf ihr Hyaluronidasebildungsvermögen hin untersucht.

- 1) Der Streptokokkenstamm der serologischen Gruppe A (Laborstamm Nr. 1)

- 2) Der Streptokokkenstamm der serologischen Gruppe A
(*Streptococcus* A Typ 14)
- 3) Der Streptokokkenstamm der serologischen Gruppe C
(*Streptococcus pyogenes animales* C)
- 4) Der Streptokokkenstamm der serologischen Gruppe C
(*Streptococcus pyogenes humanus* C)

Die Messungen der Hyaluronidaseaktivität wurden nach der turbidimetrischen Methode - wie sie später beschrieben wird - vorgenommen, nachdem die einzelnen Stämme über vier intermittierende Tier-Nährbodenpassagen gezogen worden waren. Die Technik der Verimpfung und die Art des verwendeten Nährbodens waren dieselben, wie sie bei den nachfolgenden Hauptversuchen noch aufgeführt werden.

Von den untersuchten Stämmen wurde der Stamm der serologischen Gruppe C (*Streptococcus pyogenes humanus* C) ausgewählt, da er gegenüber den anderen Stämmen der weitaus größere Hyaluronidaseproduzent war.

Für die quantitative Aussage konnte nur ein Stamm mit ausreichender Hyaluronidasproduktion herangezogen werden, obwohl es sich bei diesem Teststamm im Vergleich mit den anderen untersuchten Stämmen, die alle sofort eine hohe Mäusevirulenz zeigten, um einen Stamm mit anfangs geringerer Mäusevirulenz handelte.

M e t h o d i k :

Der lyophilisierte Teststamm (*Streptococcus pyogenes humanus* C, mit der Laborbezeichnung Nr. 4) wurde durch intermittierende Tiernährbodenpassagen in seiner Virulenz gesteigert. Einem Passagetier wurden sofort nach dem Absterben 4 Normaloesen Herzblut unter sterilen Bedingungen entnommen. Je 2 Oesen Herzblut wurden auf 2 Röhrchen mit 5 ml modifiziertem Todd-Hewitt Nährboden verimpft. Die Bouillonkulturen wurden 14 Stunden bei 37° C bebrütet, dann zentrifugiert, dekantiert und

das Sediment mit 10 ml sterilen, physiologischer NaCl-Lösung (gleiche Menge des dekantierten Bauillonüberstandes) aufgefüllt.

Nach genügender Resuspension der Bakterienaufschwemmung durch kräftiges Umschütteln in einem, mit geschliffenem Glaskolben verschlossenen Röhrchen, wurden 0,5 ml dieser Bakterienaufschwemmung dem nächsten Passagetier i.p. eingepflegt. Sofort nach dem Absterben des infizierten Passagetieres wurde in der beschriebenen Weise verfahren. Gleichzeitig wurden von jedem abgestorbenen Passagetier zwei Normaloesen Herzblut als Reinheitskontrolle auf eine Blutagarplatte verimpft, die ca. 5 % defibriniertes Hammelblut enthielt.

In parallelen Passagen wurde ein anderer Teil des Teststammes, um ihn möglichst in seiner Virulenz niedrig zu halten, über einen festen Nährboden gezogen (Blutagarplatte wie oben beschrieben). Die Bebrütung erfolgte 18 Stunden lang bei 37° C.

Das verwendete Nährmedium war ein nach Todd-Hewitt, TODD und HEWITT (24) modifizierter Nährboden nach der folgenden Bereitung und Zusammensetzung:

Auf ein Pfund gemahlenes, fettarmes Pferdefleisch wurden 1050 ml destilliertes Wasser gegeben. Die nach Umrühren noch vorhandenen Fetteile wurden mit einem Sieb abgenommen und die Fleisch-Wassermischung für eine Nacht in den Eisschrank gebracht. Darauf wurde das Gemisch 30 Minuten unter ständigem Umrühren in einem Wasserbad auf 85° erhitzt. Die Fleischbrühe wurde zu je einem Liter durch einen Grobfilter in einen Glaskolben abgefüllt. Zu jedem Liter wurden

20 g Neopepton (Difco)
2 g NaCl
2 g NaHCO₃
1 g Na₂HPO₄ . 12 H₂O
2 g Glukose

hinzugegeben und der pH-Wert mit n NaOH auf 7 eingestellt. Das Gemisch wurde dann 15 Minuten in einem Dampftopf erhitzt und abermals filtriert. An drei aufeinanderfolgenden Tagen wurde der Nährboden eine Stunde bei 120° C sterilisiert. Der End-pH-Wert wurde mit n NaOH auf 7,8 eingestellt.

Nach 26 intermittierenden Tier-Nährboden-Passagen - die direkten Tierpassagen liefen stets nach der 3. bis 4. Passage aus - wurde durch wiederholt durchgeführte Tests eine genügende Virulenz des Tier-Nährbodenpassagestammes festgestellt. Es muß jedoch gesagt werden, daß der verwendete Stamm im Verlauf der Passagen, immer wieder Virulenzschwankungen in den einzelnen Tests aufwies.

Der reine Nährbodenpassagestamm zeigte hingegen keine Virulenzschwankungen, er blieb konstant schwach virulent. Um die beiden Stammformen in ihrer Virulenz gegenüberzustellen wurde die folgende LD 50 durchgeführt:

--- Um die Ausführungen übersichtlicher zu gestalten, werden die beiden Formen des Teststammes mit virulenter und avirulenter Form bezeichnet. ---

M e t h o d i k :

Aus einer frisch gestorbenen Passagemaus (virulente Form des Teststammes) wurden je 2 Normaloesen Herzblut auf je 5 ml Todd-Hewitt-Nährbouillon verimpft und 12 Stunden bei 37° C bebrütet. Von der avirulenten Form des Teststammes wurden zwei Normaloesen von der letzten Plattenkultur ebenfalls auf je 5 ml Todd-Hewitt-Nährbouillon verimpft und 12 Stunden bei 37° C bebrütet. Im Anschluß daran wurden die Bouillonkulturen beider Stammformen zentrifugiert, der Bouillonüberstand abgossen und das Sediment mit 10 ml einer physiologischen NaCl-Lösung resuspendiert. Von beiden Ausgangssuspensionen (unverdünnt) wurden Verdünnungsreihen mit Sprüngen um je eine Zehnerpotenz angelegt. 0,5 ml von jeder Verdünnung beider Stammformen wurden männlichen Albino-mäusen von ca. 15 - 16 g in Kollektiven von je sechs Tieren i.p. injiziert. Von den drei letzten Verdünnungsstufen 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} wurden je 0,1 ml der Keimsuspension über eine ganze Blutagarplatte ausgestrichen und 18 Stunden bei 37° C bebrütet. Dies diente zur Kontrolle, ob in den hohen Verdünnungsstufen noch genügend Keime vorhanden waren, um eine tödlich verlaufende Infektion auszulösen, was zur Beurteilung des Überlebens der Tiere, die mit diesen Verdünnungen injiziert waren, von Bedeutung war. In allen Verdünnungsstufen waren ausreichend Keime vorhanden.

Die beiden nachfolgenden Tabellen zeigen die Absterbezeiten der infizierten Tierkollektive für beide Stammformen, aus denen sich die LD 50 ergibt.

Tab. 6

Absterbezeiten (in Stunden) von je sechs Tieren nach i.p. Injektionen einer Suspension des C-Streptokokkenstammes (*Streptococcus pyogenes humanus* C, Laborstamm Nr. 4) avirulente Form.

	Tier Nr.					
<u>Keimverdünnung</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>
unverdünnt	9	9,5	13,5	13,5	15	23
1:10	10	31	72	-	-	-
1:100	55	-	-	-	-	-
1:1000	sofort	50	-	-	-	-
1:10000	-	-	-	-	-	-
1:100000	-	-	-	-	-	-
1:1000000	-	-	-	-	-	-
1:10000000	-	-	-	-	-	-

Tab. 7

Absterbezeiten (in Stunden) von je sechs Tieren nach i.p. Injektion einer Suspension des C-Streptokokkenstammes (*Streptococcus pyogenes humanus* C, Laborstamm Nr. 4) virulente Form.

Tier Nr.

Keimverdünnung	1	2	3	4	5	6
unverdünnt	5	5	5	5	5	8
1:10	9,5	11	11	15	33	34
1:100	9,5	10	10	15	33	38
1:1000	17	27	30	35	46	50
1:10000	37	39	62	-	-	-
1:100000	51	67	70	72	-	-
1:1000000	-	-	-	-	-	-
1:10000000	-	-	-	-	-	-

Die LD 50 der Tabellen 6 und 7 wurden nach der Methode von REED und MUENCH (17) ausgerechnet. Es ergaben sich für die Stammvarianten folgende LD 50:

Virulente Stammform (Tier-Nährbodenpassage) 1:53 800
 Avirulente Stammform (Nährbodenpassage) 1:20

Nach der Festlegung der LD 50 und der damit verbundenen Markierung der Virulenz der beiden Teststammvarianten, wurde ihr Hyaluronidasebildungsvermögen quantitativ gegenübergestellt. Die Untersuchungen wurden nach der turbidimetrischen Methode vorgenommen, wie sie zuerst von KASS und SEASTONE (8) beschrieben und später von SCHMIDT und FABER (22) für die Untersuchungen der Streptokokkenhyaluronidase ausgebaut wurde.

Die eigenen Untersuchungen wurden teilweise in Anlehnung an die Versuchsanordnung, wie sie FABER (8) beschreibt, vorgenommen.

Der Trübungsminderungstest (turbidity reducing) beruht auf dem Prinzip, daß gereinigte, schon etwas depolymerisierte Hyaluronsäure mit überschüssigem saurem Serumalbumin, statt einer Fällung, nur noch eine Suspension ergibt. Die Trübung dieser Suspension ist abhängig von der Hyaluronsäurekonzentration. Die Trübungswerte aber werden im Maße der Fermenteinwirkung, als Ausdruck des Substratabbaues (Hyaluronsäure), in die entsprechenden Oligosaccharide gemindert. Diese Trübungsminderung ist photometrisch feststellbar.

Die Fermenteinwirkung ist stark abhängig, sowohl von der Salzkonzentration, als auch von dem pH-Wert, wie es besonders von DOREMANN und OTT (2) hervorgehoben wurde.

Verwendete Materialien und Methodik:

- 1) Als Substrat wurde hochgereinigte Hyaluronsäure - gewonnen aus menschlicher Nabelschnur - der Farbwerke Hoechst verwendet. Die Versuche wurden mit einer frischen Lösung (24 Stunden alt) von 40 mg Hyaluronsäure in 100 ml eines keimfrei filtrierten Puffers von 0,1 m Natriumacetat (analysenrein nach Merck) mit einem pH-Wert von 6 und mit 0,15 molarem Natriumchlorid (analysenrein nach Merck), durchgeführt. Der Puffer erhielt die Bezeichnung Nr. I.
- 2) Die Hyaluronidase-Lösung der virulenten und avirulenten Form des Teststammes (*Streptococcus pyogenes humanus* C) wurde nach folgendem Modus gewonnen:
Für die virulente Form des Teststammes wurden einem frisch gestorbenen Passagetier, das mit 0,5 ml einer unverdünnten Keimaufschwemmung i.p. infiziert war, zwei Normaloesen Herzblut steril entnommen und diese auf 5 ml modifizierten Todd-Hewitt -Nährboden verimpft.
Analog wurden zum gleichen Zeitpunkt von einer zwölf Stunden bei 37° C bebrüteten Blutagarplatte 2 Normaloesen der avirulenten Stammform (Nährbodenpassagestamm) auf die gleiche Menge des gleichen Nährbodens verimpft und die Bouillonkulturen 4 Stunden bei 37° C bebrütet.
Für beide Stammformen wurden Reinheitskontrollen auf Blutagarplatten angelegt und 18 Stunden bei 37° C bebrütet.
Im Anschluß an die vierstündige Bebrütungszeit wurden beide Bouillonkulturen in einem Eppendorphotometer (600 m μ) in ihrem Trübungsgrad nephelometrisch verglichen. Die avirulente Form (Nährbodenpassagestamm), die eine größere Trübung aufwies, wurde mit steriler

physiologischer NaCl-Lösung auf denselben Trübungsgrad der virulenten Stammform gebracht.

Aus beiden Vorkulturen wurde je 1 ml Bouillonkultur in 100 ml des gleichen Nährbodens weiterverimpft.

Die Bouillonkulturen beider Stammvarianten wurden darauf unter gleichen Bedingungen 24 Stunden bei 37° C bebrütet.

Nach 12, 18 und 24 Stunden wurden unter sterilen Bedingungen jeweils 20 ml der Kulturbouillon, nach Umschütteln des Kölbchens, diesem entnommen und weiterverarbeitet.

Die entnommene Kulturbouillon wurde für 20 Minuten bei 3 000 Umdrehungen zentrifugiert und der Bouillonüberstand Seitz(EKS)-filtriert. Das Filtrat wurde in Dialisierschläuche gegeben, die vorher in Äthylenoxyd sterilisiert worden waren. Zwei Tage wurden die Filtrate dann gegen fließendes Leitungswasser (bei ca. 14° C) und einen Tag gegen den, mit Nr. I bezeichneten Puffer dialysiert.

Die so gewonnenen "Hyaluronidaselösungen" wurden in kleinen Kölbchen (steril) für zwei Tage bei -5° C im Gefrierfach aufbewahrt. Der pH-Wert der Dialysate lag einheitlich bei 6,1.

- 3) Das Serumreagens wurde aus gesammeltem Kaninchenblut gewonnen. Zehn Kaninchen wurden je 10 ml Blut, unter weitgehend sterilen Bedingungen, aus der Ohrvene entnommen, so daß eine genügende Menge Serum erhalten wurde.

Das Serum wurde 1:10 mit einer 0,5 m Natriumacetatlösung (analysenrein nach Merck) mit einem pH-Wert von 4,2 verdünnt und darauf der pH-Wert auf 3,1 durch Zugabe einer 4 n Salzsäurelösung eingestellt.

- 4) Von der gewonnenen Hyaluronidaselösung beider Stammvarianten wurde eine Verdünnungsreihe mit dem, als Nr. I bezeichneten Puffer, angelegt. 0,5 ml der Hyaluronidaselösung wurde in 2 Reihen, in dafür besonders gereinigte Reagenzröhrchen mit gleicher Wandstärke gegeben. Ebenso wurden 0,5 ml (0,2 mg Hyaluronsäure) einer am Vortage bereiteten Hyaluronsäurelösung mit einer automatischen Pipette zu jedem Röhrchen dazugegeben. Sofort nach der Mischung zwischen dem Ferment und dem Substrat wurden die Röhrchen für 30 Minuten in ein elektrisch reguliertes Wasserbad bei 37° gebracht.

Nach 30-minütiger Einwirkungszeit wurde das Ferment in einem weiteren Wasserbad bei 60° C und 10 Minuten Einwirkungsdauer zerstört.

Mit einer automatischen Pipette wurde daraufhin in jedes Röhrchen 4 ml eines Gemisches von 1 ml saurem Serumreagenz und 3 ml des als Nr. II bezeichneten Puffers, gegeben.

30 Minuten nach der Zugabe des Serumreagenzgemisches wurde der Grad der Trübung, respektive ihre Minderung, als optische Dichte in einem Eppendorffphotometer (bei einer Wellenlänge von 600 m μ) und Einstellung der höchsten Empfindlichkeitsstufe, abgelesen. Als Kontrolle diente ein Parallelansatz, in dem die Streptokokkenhyaluronidase vorher zerstört worden war und zwar nach der gleichen Methode wie oben beschrieben. Die abgelesenen Ergebnisse wurden in % ausgedrückt, wobei die Trübungsminderung der einzelnen Teströhrchen in Beziehung zur Kontrolle gesetzt wurde.

In den nachfolgenden Tabellen sind die Werte der Hyaluronidaseproduktion, bei verschiedenen Entnahmezeiten, beider Teststammformen einander gegenübergestellt.

Tab. 8

Messwerte (Trübungsminderung) der Hyaluronidasemenge in Prozent der virulenten und avirulenten Stammformen nach zwölfstündiger Bebrütungszeit bei 37° Celsius.

V i r u l e n t e S t a m m f o r m

		Fermentverdünnungen				
		konz.	1:5	1:10	1:25	1:50
Trübungs- grad	Kontr. +Standard	100	100	100	100	100
	Tierpass. Stamm					
	I. Reihe	99 1%	100	100	100	100
	Tierpass. Stamm					
	II. Reihe	100	100	100	100	100

A v i r u l e n t e S t a m m f o r m

		Fermentverdünnungen				
		konz.	1:5	1:10	1:25	1:50
Trübungs- grad	Kontr. +Standard	100	100	100	100	100
	Nährb.pass. Stamm					
	I. Reihe	96 4%	100	100	100	100
	Nährb.pass. Stamm					
	II. Reihe	96 4%	100	100	100	100

Tab. 9

Messwerte (Trübungs-minderung) der Hyaluronidasemenge in Prozent der virulenten und avirulenten Stammformen nach achtzehnstündiger Bebrütungszeit bei 37° Celsius.

V i r u l e n t e S t a m m f o r m

		Fermentverdünnungen				
		konz.	1:5	1:10	1:12	1:50
Trübungs- grad	Kontr. +Standard	100	100	100	100	100
	Tierpass. Stamm	90	90	97	100	100
	I. Reihe	10%	10%	3%	-	-
	Tierpass. Stamm	89	92	98	100	100
	II. Reihe	11%	8%	2%	-	-

A v i r u l e n t e S t a m m f o r m

		Fermentverdünnungen				
		konz.	1:5	1:10	1:25	1:50
Trübungs- grad	Kontr. +Standard	100	100	100	100	100
	Nährb.pass. Stamm	72	67	68	93	100
	I. Reihe	28%	33%	32%	7%	-
	Nährb.pass. Stamm	76	68	69	89	100
	II. Reihe	24%	32%	31%	11%	-

Messwerte (Trübungsminderung) der Hyaluronidasemenge in Prozent der virulenten und avirulenten Stammformen nach vierundzwanzigstündiger Bebrütungszeit bei 37° Celsius.

V i r u l e n t e S t a m m f o r m

		Fermentverdünnungen				
		konz.	1:5	1:10	1:25	1:50
Trübungs- grad	Kontr. +Standard	100	100	100	100	100
	Tierpass. Stamm	95	98	100	100	100
	I. Reihe	5%	2%	-	-	-
	Tierpass. Stamm	94	98	98	100	100
	II. Reihe	6%	2%	2%	-	-

A v i r u l e n t e S t a m m f o r m

		Fermentverdünnungen				
		konz.	1:5	1:10	1:25	1:50
Trübungs- grad	Kontr. +Standard	100	100	100	100	100
	Nährb.pass. Stamm	89	92	95	100	100
	I. Reihe	11%	8%	5%	-	-
	Nährb.pass. Stamm	90	94	98	100	100
	II. Reihe	10%	6%	2%	-	-

Nach den ermittelten Ergebnissen kann gesagt werden, daß nach zwölfstündiger Bebrütungszeit bei 37° C (Tabelle Nr. 8), wenn überhaupt, nur minimale Fermentmengen von beiden Stammformen gebildet werden.

Die avirulente Form des Teststammes bildete zu dieser Zeit in geringem Maße mehr Ferment als die virulente Stammform.

Das Hyaluronidasebildungsvermögen der einzelnen Streptokokkenstämme ist mengenmäßig sehr unterschiedlich. Andere Autoren MAC LENNAN (12) fanden in ihren Untersuchungen unter ähnlichen Wachstumsbedingungen für die zu untersuchenden C-Streptokokkenstämme schon nach Abschluß der logarithmischen Wachstumsphase die höchsten Hyaluronidasetiter. Bei dem von uns verwendeten Teststamm handelte es sich zwar um den relativ stärksten Hyaluronidasebildner im Verhältnis zu den mituntersuchten anderen Streptokokkenstämmen. Gemessen an den Befunden anderer Autoren war der von uns verwendete Teststamm jedoch ein Stamm mit nur geringer Fermentaktivität.

PIKE (15) hingegen fand in seinen Untersuchungen unter anderem auch Streptokokkenstämme der serologischen Gruppe A, die erst nach weit längeren Bebrütungszeiten, ja erst nach Tagen, meßbare Fermentaktivitäten aufwiesen. Die Befunde von MC CLEAN (13) und besonders auch von ROGERS (18) zeigten, daß die Hyaluronidaseproduktion in erster Linie an die Anwesenheit des Substrates (Hyaluronsäure) gebunden ist. Die Menge der Hyaluronidaseproduktion ist sicher adaptiv beeinflussbar, hierfür sprechen die Befunde von SALLMAN und BIRKELAND (20).

Die genannten Autoren fanden von neun A-Streptokokkenstämmen in hyaluronatfreien Medien sechs Stämme (Typ 10, 11, 5, 9) als hyaluronidasebildend. Im Verlauf von zehn Passagen in hyaluronathaltigen Medien wurden drei nicht-hyaluronidasebildende Stämme ebenfalls hyaluronidasepositiv. Diese Stämme verloren jedoch diese Eigenschaft wieder nach vier Passagen im hyaluronatfreien Medium.

Diese verschiedenen Befunde zeigen, daß, entgegen der bisherigen Annahme, eine größere Anzahl von Streptokokkenstämme unter bestimmten Bedingungen Hyaluronidase produzieren.

Da in unseren Versuchen die Kulturbedingungen für beide Stammvarianten zum Zeitpunkt der Hyaluronidasemessung gleich waren, hätte man erwarten müssen, daß die virulente Form des Teststammes eine höhere Fermentaktivität als die avirulente Form aufweisen würde, wenn man die höhere Virulenz eines Streptokokkenstammes mit der Menge der produzierten Hyaluronidase in Zusammenhang bringt.

Nach den Untersuchungen von SALLMAN und BIRKELAND (20) töteten hyaluronidaseproduzierende Streptokokkenstämme in weitaus höherem Maße infizierte Hühnerembryone ab, als nicht hyaluronidasebildende Stämme.

In der von uns durchgeführten LD 50 unserer beiden Teststammformen zeigte die Tierpassageform eine deutlich gesteigerte Virulenz gegenüber der Nährbodenpassageform. Die quantitativ gefundenen Hyaluronidasewerte für beide Stammvarianten standen zu den Entnahmezeiten nach 12, 18 und 24 Stunden aber im umgekehrten Verhältnis zur vorher ermittelten Virulenz.

Es wurde also die avirulente Stammvariante durch die Nährbodenpassagen zwar in ihrer Virulenz herabgehalten, das Hyaluronidasebildungsvermögen blieb jedoch erhalten, bzw. trat sogar bei Einbringen in die gleichen Kulturbedingungen (modifizierter Todd-Hewitt-Nährboden), wie für die virulente Stammform, in verstärktem Maße auf.

Nach vierundzwanzigstündiger Bebrütungszeit, Tabelle Nr. 10, zeigte sich für beide Stammformen ein paralleler Abfall der Fermentaktivität, was den Befunden anderer Autoren MAC LENNAN (12), PIKE (15) entspricht.

D i s k u s s i o n :

Werden die im zweiten Teil unserer experimentellen Versuche erhobenen Befunde, nämlich der mehr oder minder gleichbleibenden Hyaluronidaseproduktion beider Stammvarianten, wobei sogar eine gewisse Mehrproduktion der avirulenten Stammform verzeichnet wurde, in Relation zu der ersten Versuchsreihe (I. Teil) gesetzt, nach welcher die Hyaluronidase als Virulenzfaktor angesprochen werden mußte, so scheint ein direkter Widerspruch zu bestehen.

Bei einer kritischen Betrachtung der Fehlermöglichkeiten glauben wir jedoch nicht, daß das Ergebnis eventuell durch einen methodischen Fehler bedingt ist, vielmehr scheint ein Rückschluß von dem quantitativen Hyaluronidasebildungsvermögen eines Stammes in vitro auf seine Virulenz aus anderen Gründen nicht gestattet.

Wir glauben, die Ursache hierfür in erster Linie in dem umgebenden Milieu des Teststammes suchen zu müssen. Es zeigte sich in unserer ersten Versuchsserie, daß im Infektionsfeld auftretende Hyaluronidase, je nach Menge, den Infektionsablauf beeinflussen kann. Es ist hierbei sicherlich im Hinblick auf unsere Fragestellung gleichgültig, ob die Hyaluronidase von außen in das Infektionsfeld gebracht ist, oder ob sie von den dort vorhandenen Keimen produziert wurde.

Lediglich die gebildete Hyaluronidasemenge in Bezug auf unser gewähltes Modell dürfte differieren. Wir glauben nicht, daß unter natürlichen Bedingungen so extrem hohe Hyaluronidasekonzentrationen im Infektionsfeld auftreten, wie sie von uns appliziert wurden. Andererseits ändert diese Annahme an der nachfolgenden Zeitsterblichkeitsrelation insofern nichts, als die Absterbezeit in einem reziproken Verhältnis zur applizierten Hyaluronidase stand.

Man muß also annehmen, daß ein stark hyaluronidasebildender, pathogener Streptokokkenstamm sich analog verhalten wird, d.h. sich in dem Milieu als virulenter erweisen wird, als eine schwach- oder nicht-hyaluronidaseproduzierende Stammvariante.

Wir möchten diese Annahme trotz der Tatsache aufrecht halten, daß es uns nicht gelang, in vitro eine Differenz zwischen beiden Varianten unseres Teststammes in ihrem Hyaluronidasebildungsvermögen nachzuweisen. Hierfür sprechen auch die Befunde, daß pathogene, aber avirulente Keime, durch eine Mischinfektion mit Hyaluronidasebildnern spontan aktiviert werden können.

Zusammenfassend kann man also sagen, daß für die Virulenz unseres Stammes andere Faktoren von entscheidender Bedeutung waren, die Hyaluronidasebildung wahrscheinlich sogar in diesem Falle eine untergeordnete Rolle gespielt hat. Sie kann also nicht einer der entscheidenden Virulenzfaktoren für den gewählten Streptokokkenstamm gewesen sein.

Im Hinblick auf unsere anfangs gestellte Frage, "In welchem Maße ist der Ablauf einer experimentellen Streptokokkeninfektion durch im Infektionsfeld auftretende Hyaluronidase beeinflussbar?", läßt sich aufgrund der erhobenen Befunde folgendes aussagen: die Hyaluronidase hat einen deutlichen Einfluß auf den Ablauf einer experimentellen Infektion.

Im vorliegenden Fall bewirkte sie einen zeitlichen Ablauf, wie er auch durch einen virulenten Keim ausgelöst werden kann. Es sei jedoch in diesem Zusammenhang auf die Untersuchungen von ROTHBART (19) hingewiesen, in denen bekapselte Streptokokken bei Hyaluronidaseapplikation dekap-suliert wurden und eine Virulenzeinbuße erlitten.

Im Hinblick auf unsere Versuchsergebnisse mit einem schwach kapselbildenden C-Streptokokkenstamm stand offenbar der "spreading effect" im Vordergrund. Diese, sicherlich situations- und milieuabhängige Funktion der Hyaluronidase als Virulenzfaktor steht im Einklang mit den Befunden von SALLMAN und BIRKELAND, die vorher erwähnt wurden.

Zur zweiten Frage, die an den Anfang unserer Untersuchung gestellt wurde, "Besteht eine Parallelität zwischen der Virulenz eines Keimes und seiner Hyaluronidaseproduktion?", läßt sich durch den in vitro durchgeführten Versuch nicht nachweisen. Da unser Teststamm einen hohen Virulenzgrad aufwies, jedoch die virulente Stammvariante nur geringere Hyaluronidasemengen produzierte, darf angenommen werden, daß die Hyaluronidase hier nur eine unterstützende Funktion im Virulenzverhalten hatte, jedoch nicht den entscheidenden Faktor darstellte.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. BILLERBECK, K.H.
Steht der Hyaluronsäure-Hyaluronidase Komplex in einer Schlüsselstellung für das pathologische und physiologische Geschehen an den Interzellular-Grenzflächen?
Ärztl. Forsch. 6, I. 197-221 (1952)
2. DORFMANN, A. and OTT, M.L.
A turbidimetric method for the assay of hyaluronidase
J. Biol. Chem. 172, 367-375 (1948)
3. DURAN - REYNALS, F.
Studies on certain spreading factor existing in bacteria and its significance for bacterial invasiveness
J. exp. Med. 58, 161-188 (1933)
4. DURAN - REYNALS, F.
Further studies on the influence of testicle extract upon the effect of toxins, bacteria and viruses, and on the Schwartzmann and Arthus phenomena
J. exp. Med. 58, 451-462 (1933)
5. DURAN - REYNALS, F.
Tissue permeability and the spreading factors in infection
Bact. Rev. 6, 197-252 (1942)
6. FABER, V.
Streptococcal hyaluronidase
Acta Pathol. and Mikrobiol. Scand.
XXXI 346-354 (1952)
7. GIBIAN, H.
Mucopolysaccharide und Mucopolysaccharidasen
Wien (1959)

8. HECHTER, O.
Mechanisms of spreading factor action
Ann.N.Y.Acad.Sci. 52, 1028-1040 (1950)
9. HIRST, G.K.
The effect of a polysaccharide-splitting enzyme
on streptococcal infection
J. Exp. Med. 73, 493-506 (1941)
10. KASS, E.H. and SEASTONE, C.V.
The role of the mucoid polysaccharide (hyaluronic
acid) in the virulence of group A hemolytic strep-
tococci
J. exp. Med. 79, 319-330 (1944)
11. KLIEWE, H. und v.WASIELEWSKI, E.
Begriff und Wesen der Pathogenität, Infektiosität
und Virulenz von Bakterien
Ärztl. Forsch. XI/4, 165-179 (1957)
12. MAC LENNAN, A.P.
The production of capsules, hyaluronic acid and
hyaluronidase by 25 strains of group C streptococci
J.Gen.Mikrobiol. 15, 485-492 (1956)
13. McCLEAN, D.
The capsulation of streptococci and its relation
to diffusion factor (hyaluronidase)
J.Path.Bact. 53, 13-27 (1941)
14. MEYER, K.G. CHAFFEE, E. HOBBY, G.L. and DAWSON, M.H.
Hyaluronidase of bacterial and animal origin
J.exp. Med. 73, 309-326 (1941)
15. PIKE, R.M.
Streptococcal hyaluronic acid and hyaluronidase.
I.Hyaluronidase activity of non capsulated group A
streptococci
J.Inf.Dis. 83, 1-11 (1948)

16. PRIGGE, R.
Experimentelle Untersuchungen zur Chemotherapie der
Tuberkulose II
Klin.Wschr. 20, 633-637 (1941)
17. REED, L.J. and MUENCH, H.
A simple method of estimating fifty per cent endpoints
Am.J.Hyg. 27, 493-497 (1938)
18. ROGERS, H.J.
The influence of hydrolysates of hyaluronate upon
hyaluronidase-production by microorganisms
Biochem.J. 40, 583-588 (1946)
19. ROTHBARD, S.
Protective effect of hyaluronidase and type-specific
anti-M-serum on experimental group A streptococcus
infection in mice
J. exp. Med. 88, 325-341 (1948)
20. SALLMAN, B. and BIRKELAND, J.M.
The role of hyaluronidase hemolytic-streptococcal
infection
Ann. N. Y. Acad.Sci. 52, 1062-1069 (1950)
21. SALLMAN, B. and BIRKELAND, J.M. and GRAY, C.T.
Hyaluronic acid utilisation by hemolytic streptococci
in relation to possible hyaluronidase function in
pathogenesis
Proc.Soc. exp. Biol.Med. 76, 467-771 (1951)
22. SCHMIDT, K. and FABER, V.
The turbimetric method for determination of
hyaluronidase
Scand. J. Clin.Lab.Invest. 2, 292-297 (1950)
23. SNEDECOR, G.W.
Statistical methods
IOWA State Coll.Press.Ames (Iowa) (1953)

24. TODD, E.W. and HEWITT, L.F.

A new culture medium for the production of antigene streptococcal hemolysin
J. Path. Bact. 35, 973-975 (1932)

25. v.WASIELEWSKI, E.

Das Virulenzproblem der A Streptokokken unter besonderer Berücksichtigung bestimmter Invasionsfaktoren
Habilitationsschrift Mainz (1955)

Lebenslauf.

Am 9. Mai 1932 wurde ich als Sohn des Arztes Hermann Willebrand und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Beneke in Reuterstadt-Stavenhagen (Mecklenburg) geboren. Nach zwölfjähriger Schulzeit legte ich im Juni 1951 am humanistischen Gymnasium zu Rostock die Reifeprüfung ab. Im gleichen Monat floh ich in die Deutsche Bundesrepublik. Hier arbeitete ich ein Jahr im Peiner Walzwerk und begann anschliessend im Wintersemester 1952 mit dem Studium der Veterinärmedizin in Hannover.

Im Wintersemester 1953 bestand ich das Vorphysikum und wechselte im Sommersemester 1954 zur Medizin über. Das Physikum absolvierte ich im Wintersemester 1956 in Bonn.

Nach sechssemestrigem Studium legte ich im Juni 1959 das medizinische Staatsexamen in Mainz ab.

Meine Ausbildung als Medizinalassistent begann ich im gleichen Monat am Städtischen Krankenhaus in Meisenheim-Glan, das unter chirurgischer Leitung steht.

Von Mai 1960 bis Februar 1961 war ich vorwiegend mit der Anfertigung meiner Doktorarbeit am Hygiene-Institut der Mainzer Universität beschäftigt.

Die weiter vorgeschriebene Ausbildungszeit als Medizinalassistent leistete ich auf der gynäkologisch-geburtshilflichen und inneren Abteilung des Stadtkrankenhauses in Kaiserslautern ab.

Am 31.1.1962 wurde mir die Approbation als Arzt erteilt. Seit 1.3.1962 bin ich mit der Verwaltung einer Assistentenstelle an der Mainzer chirurgischen Universitätsklinik beauftragt.

